

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 08-140671  
 (43)Date of publication of application : 04.06.1996

(51)Int.Cl. C12N 1/21  
 C12N 15/09  
 // C12P 21/02  
 (C12N 1/21  
 C12R 1:19 )  
 (C12P 21/02  
 C12R 1:19  
 C12R 1:21 )

(21)Application number : 06-315626  
 (22)Date of filing : 25.11.1994

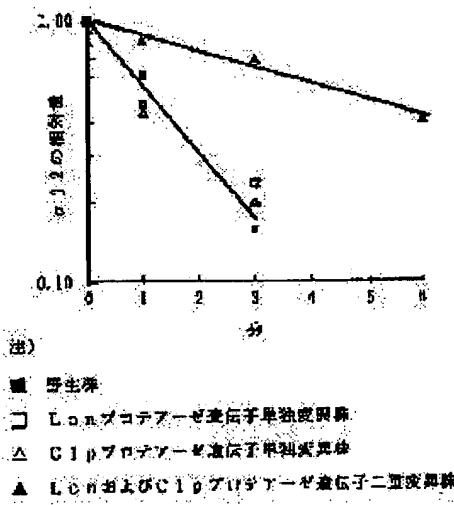
(71)Applicant : H S P KENKYUSHO:KK  
 (72)Inventor : KITAGAWA MASASHIGE  
 YANAGI HIDEKI  
 YURA TAKASHI

## (54) ESCHERICHIA COLI MUTANT

### (57)Abstract:

**PURPOSE:** To obtain a new mutant strain which has a mutant gene that can stably hold an unstable protein expressed in the cell bodies of Escherichia coil and can inhibit an extraneous useful protein expressed in the cell bodies from being decomposed, thus is useful as versatile host for expression of extraneous protein.

**CONSTITUTION:** This new Escherichia coil mutant has a mutant gene that can keep an unstable protein such as an extraneous protein expressed in the cell bodies stable, since a heat-shock transcription factor  $\sigma$ 32 is stabilized by transducing a mutant gene having mutation in the *plsX* gene. Thus, the extraneous useful protein expressed in the cell bodies can be prevented from intracellular decompositions, and the mutant can be used as a versatile host for protein expression. This mutant is obtained by culturing *E. coli* MC4100 overnight and treating it with  $\lambda$  1098 phage solution and selecting a *pls* X gene mutant strain with high  $\sigma$ 32 content from the colony. Or an existing *E. coli* strain is infected with a phage solution prepared from a protease-deficient strain and select a double mutant strain of Lon and Clp protease genes.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or

[application converted registration]  
[Date of final disposal for application]  
[Patent number]  
[Date of registration]  
[Number of appeal against examiner's decision  
of rejection]  
[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]  
[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-140671

(43)公開日 平成8年(1996)6月4日

(51)Int.Cl. <sup>a</sup> C 12 N 1/21 15/09 // C 12 P 21/02 (C 12 N 1/21	識別記号 ZNA	序内整理番号 8828-4B C 9282-4B 9281-4B	F I	技術表示箇所 ZNA A 審査請求 未請求 請求項の数10 FD (全7頁) 最終頁に続く
--	-------------	---	-----	---

(21)出願番号 特願平6-315626

(22)出願日 平成6年(1994)11月25日

(71)出願人 594206705  
株式会社エイチ・エス・ピー研究所  
大阪市中央区道修町2丁目2番8号

(72)発明者 北川 正成  
滋賀県野洲郡野洲町小森原2135-14-307

(72)発明者 柳 秀樹  
兵庫県宝塚市花屋敷松ガ丘14番26号

(72)発明者 由良 隆  
京都市左京区修学院茨間町12

(74)代理人 弁理士 細田 芳徳

(54)【発明の名称】 大腸菌変異株

(57)【要約】

【構成】大腸菌内で発現された不安定蛋白質を安定に保持する変異遺伝子を有することを特徴とする大腸菌変異株、該大腸菌変異株を用いることを特徴とする大腸菌内での不安定蛋白質の安定化方法、該大腸菌変異株を使用することを特徴とする外来蛋白質の製造方法、および該大腸菌変異株を外来遺伝子を含む組換えDNA分子で形質転換させたことを特徴とする形質転換体。

【効果】大腸菌内で発現された不安定蛋白質を安定に保持する変異遺伝子を有する本発明の大腸菌変異株は、発現した外来性有用蛋白質の菌体内分解を抑えることができるため、汎用性の高い蛋白質発現系宿主を提供することができる。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 大腸菌内で発現された不安定蛋白質を安定に保持する変異遺伝子を有することを特徴とする大腸菌変異株。

【請求項2】 熱ショック転写因子 $\sigma^{70}$ が安定化されている請求項1記載の変異株。

【請求項3】 不安定蛋白質が外来蛋白質である請求項1記載の変異株。

【請求項4】 变異遺伝子が $p_{1sX}$ 遺伝子に変異を生じたものである請求項1~3いずれか記載の変異株。

【請求項5】 請求項1~4いずれか記載の大腸菌変異株を用いることを特徴とする、大腸菌内での不安定蛋白質の安定化方法。

【請求項6】  $L_{on}$ および $C_1p$ プロテアーゼ遺伝子と共に変異を有する大腸菌変異株を用いることを特徴とする、大腸菌内での不安定蛋白質の安定化方法。

【請求項7】 不安定蛋白質が大腸菌由來の蛋白質である請求項5または請求項6記載の安定化方法。

【請求項8】 不安定蛋白質が外来蛋白質である請求項5または請求項6記載の安定化方法。

【請求項9】 請求項1~4いずれか記載の大腸菌変異株を使用することを特徴とする外来蛋白質の製造方法。

【請求項10】 請求項1~4いずれか記載の大腸菌変異株を、外来遺伝子を含む組換えDNA分子で形質転換させたことを特徴とする形質転換体。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、菌体内における蛋白質分解活性の低い大腸菌変異株に関する。さらに詳しくは、大腸菌の菌体内で極めて不安定な蛋白質に対する分解活性を減弱化させた大腸菌変異株、これを利用する不安定蛋白質の大腸菌内での安定化方法、外来蛋白質の製造方法、およびそれに用いる形質転換体に関する。

## 【0002】

【従来の技術】従来、大腸菌を用いて外来遺伝子の発現により有用蛋白質を产生する場合において、大腸菌の菌体内で急速に分解される蛋白質があることが知られている。しかしながら、かかる有用蛋白質の菌体内分解を防ぐための広く有効な方法は知られていないのが現状である。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、大腸菌の菌体内で不安定なかかる有用蛋白質を安定に保持し得る大腸菌変異株を提供することにある。本発明の他の目的は、かかる大腸菌変異株を用いることにより、不安定な蛋白質を大腸菌内で安定化する方法を提供することにある。本発明の他の目的は、かかる大腸菌変異株を用いることにより、外来蛋白質を製造する方法を提供することにある。本発明のさらに他の目的は、かかる大腸菌変異株を外来遺伝子を含む組換えDNA分子で形質転

2

換させた形質転換体を提供することにある。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、熱ショック蛋白質(HSP)遺伝子の発現に重要な役割を果たす転写因子 $\sigma^{70}$ をモデルとして選び、 $\sigma^{70}$ を安定化する大腸菌変異株を取得すれば、プロテアーゼの欠失とHSPのシャベロン機能との相乗効果により、外来遺伝子の発現産物をも安定化し得るものと期待し、研究を行った。

【0005】即ち、生物が温度、圧力、放射線、紫外線、金属イオン、酸素、無機または有機化合物等の外部環境の変化に曝されると、それはストレスとして生物に作用し、生物はこれらのストレスに対して細胞レベルで様々な方法で対処する能力を備えている。このような応答をストレス応答といい、その中心をなす反応はストレス蛋白質と呼ばれる一群の蛋白質の発現であり、大腸菌からヒトまで共通して働く生体防御機構である。これまでのところ、最も研究が進んでいるストレス蛋白質は、HSPである。

【0006】HSPは、高温時に誘導的に合成されるが、上記の様々なストレスによっても合成される。その機能は、他のペプチドと結合して、正しい折り畳み(高次構造の形成)や、第三の蛋白質や核酸との会合(複合体の形成)、さらに複合体からの解離を助けるほか細胞内での膜透過、局在化にも関与するなど、いわゆる分子シャベロン(介添え分子)と呼ばれる機能を担っていることが最近明らかになってきた。HSPはストレスにより誘導的に合成されることから、生物がストレス時に一時的にそれらの蛋白質を必要とすると考えられるが、恒常的にある程度作られているものがあるので、平時でもHSPは重要な役割を担っているものと考えられる。そして、HSPの発現には、転写因子 $\sigma^{70}$ が中心的な役割を果たしていることが知られている。かかる $\sigma^{70}$ は、通常、大腸菌体内では極めて不安定であるが、 $\sigma^{70}$ を安定に保持し得る大腸菌変異株であれば、 $\sigma^{70}$ を分解するプロテアーゼを欠失しているはずであり、さらに $\sigma^{70}$ によって產生される大量のHSPのシャベロン機能により、外来遺伝子の発現により產生された有用蛋白質を安定に保持し得るはずである。

【0007】本発明者らは、このような考えに基づき不安定蛋白質のモデルとして、熱ショックプロテイン(HSP)遺伝子の発現に関わる転写因子 $\sigma^{70}$ を用い、この蛋白質を安定化させる大腸菌変異株の探索研究を行ったところ、 $p_{1sX}$ 遺伝子を変異させた新規な大腸菌変異株が $\sigma^{70}$ を安定化することを見出した。また、既知プロテアーゼの変異株の中で $\sigma^{70}$ を安定化する変異株の探索を行ったところ、 $L_{on}$ プロテアーゼ遺伝子および $C_1p$ プロテアーゼ遺伝子の両方に変異を有する二重変異株が顕著な $\sigma^{70}$ の安定化を示すことが見出された。本発明は、これらの知見に基づき、さらに研究を進めて完成さ

れるに至ったものである。

40 【0008】本発明者らは、熱ショックプロテイン(HSP)遺伝子の発現に関わる転写因子 $\sigma^{70}$ を用い、この蛋白質を安定化させる大腸菌変異株の探索研究を行ったところ、 $p_{1sX}$ 遺伝子を変異させた新規な大腸菌変異株が $\sigma^{70}$ を安定化することを見出した。また、既知プロテアーゼの変異株の中で $\sigma^{70}$ を安定化する変異株の探索を行ったところ、 $L_{on}$ プロテアーゼ遺伝子および $C_1p$ プロテアーゼ遺伝子の両方に変異を有する二重変異株が顕著な $\sigma^{70}$ の安定化を示すことが見出された。本発明は、これらの知見に基づき、さらに研究を進めて完成さ

【0008】即ち、本発明の要旨は、(1) 大腸菌内で発現された不安定蛋白質を安定に保持する変異遺伝子を有することを特徴とする大腸菌変異株、(2) 熱ショック転写因子 $\sigma^{70}$ が安定化されている前記(1)記載の変異株、(3) 不安定蛋白質が外来蛋白質である前記(1)記載の変異株、(4) 変異遺伝子が $p\lambda sX$ 遺伝子に変異を生じたものである前記(1)～(3)いずれか記載の変異株、(5) 前記(1)～(4)いずれか記載の大腸菌変異株を用いることを特徴とする、大腸菌内での不安定蛋白質の安定化方法、(6)  $L_{on}$ および $C_{lp}$ プロテアーゼ遺伝子と共に変異を有する大腸菌変異株を用いることを特徴とする、大腸菌内での不安定蛋白質の安定化方法、(7) 不安定蛋白質が大腸菌由来の蛋白質である前記(5)または(6)記載の安定化方法、(8) 不安定蛋白質が外来蛋白質である前記(5)または(6)記載の安定化方法、(9) 前記(1)～(4)いずれか記載の大腸菌変異株を使用することを特徴とする外来蛋白質の製造方法、並びに(10) 前記(1)～(4)いずれか記載の大腸菌変異株を、外来遺伝子を含む組換えDNA分子で形質転換させたことを特徴とする形質転換体、に関する。

【0009】以下に本発明の詳細について説明する。本発明の大腸菌変異株は、大腸菌内で発現された不安定蛋白質を安定に保持する変異遺伝子を有するものであり、例えば熱ショック転写因子 $\sigma^{70}$ が安定化されている大腸菌変異株が挙げられる。具体的には、変異遺伝子が $p\lambda sX$ 遺伝子に変異を生じたものが例示される。また、本発明はこのような大腸菌変異株を用いて大腸菌内で発現する不安定蛋白質を安定化する方法を提供する。該方法には、前記のような $p\lambda sX$ 遺伝子に変異を生じた新規な大腸菌変異株の他に、既知の変異株ではあるが、 $L_{on}$ および $C_{lp}$ プロテアーゼ遺伝子と共に変異を有する大腸菌変異株を用いても不安定蛋白質を安定化することができる。

【0010】ここで、本発明において不安定蛋白質とは、大腸菌内で発現しても速やかに分解を受ける蛋白質をいい、本来きわめて半減期の短い、例えば熱ショック転写因子 $\sigma^{70}$ のような大腸菌由来の蛋白質や大腸菌以外の生物由来で好ましくは哺乳類由来の外来有用蛋白質のうち大腸菌内で分解を受けやすく高発現が困難な蛋白質を意味する。また、ここで言う「安定化」とは当該蛋白質の半減期を有意に延長することをいう。半減期は、例えば放射標識したアミノ酸を用いたバルス-チェイス実験により測定することができる。

【0011】本発明の大腸菌変異株は、以下の方法により取得することができる。 $\sigma^{70}$ を不安定蛋白質のモデル蛋白質として選び、 $\sigma^{70}$ を安定化する変異株を選別する。 $\sigma^{70}$ 自体の発現量を確認するのは容易でないので、 $\sigma^{70}$ をコードする遺伝子 $rpoH$ 遺伝子の3'端に $lacZ$ 遺伝子を融合させた $rpoH-lacZ$ 融合遺伝子

の産物が $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性により簡便に検出できることを利用し、 $\sigma^{70}$ 自体の定量と併用する。すでに、 $rpoH$ 遺伝子のほぼ全領域と $lacZ$ 遺伝子との融合遺伝子であるGF807の産物が $\sigma^{70}$ と同様に不安定であることが明らかにされている(Naqai et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 91, 10280-10284 (1994))。

【0012】大腸菌変異株の作成のために、まずGF807融合遺伝子をもつ入ファージで溶原化した大腸菌MC4100 $\lambda$ GF807にmini Tn10(tet)をもつ入ファージ $\lambda$ 1098を使って挿入変異を導入する。GF807融合遺伝子をもつ入ファージ( $\lambda$ GF807)およびその溶原菌MC4100 $\lambda$ GF807は、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) Vol.88 p10515-10519 (Naqai, H. et al.)に記載の方法に従って作製することができる。mini Tn10(tet)とは、テトラサイクリン耐性遺伝子を含むトランスポゾンであり、mini Tn10(tet)をもつ入ファージ( $\lambda$ 1098)は、具体的には、Gene(1984) Vol.32 p369-379 (Way, J. C. et al.)に記載の方法に従って作成することができる。

【0013】 $\lambda$ 1098によるMC4100 $\lambda$ GF807への挿入変異の導入は、例えば以下のようにして行う。MC4100 $\lambda$ GF807をL培地(1%バクトリブトロント(Difco 製)、0.5%バクトイーストエキストラクト(Difco 製)、0.5%NaCl)で培養する。この菌液に $\lambda$ 1098ファージ液を加えて培養した培養液をL培地で希釈し、テトラサイクリンを含むMacConkey-Lactose 寒天培地(Difco 製)に塗布する。

【0014】挿入変異のスクリーニングは、例えば以下のようにして行う。 $\lambda$ 1098により処理された大腸菌MC4100 $\lambda$ GF807を、テトラサイクリンを含むMacConkey-Lactose 寒天培地(Difco 製)上で培養し、赤色の濃いコロニー( $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の強い株)を選別する。通常、約1000個のテトラサイクリン耐性株から約1個の赤の程度の濃いコロニーが選択される。

【0015】選択株の中から $\sigma^{70}$ の安定性の高い株を選別するため、選択株中の $\sigma^{70}$ 量を測定する。測定法は例えば以下のとおりである。候補株を37°CのL培地で対数増殖期中期まで培養し、培養液に10%TCAを加え生育を止める。これを遠心分離にかけ沈殿をアセトンで洗浄、乾燥後、1%SDS、10mM Tris-HCl pH8.0に溶解し煮沸する。さらに遠心分離にかけ、上清の含有蛋白質量を測定する。蛋白質20 $\mu$ g相当に等体積の0.1%BPB、10%グリセロール、2%SDS、100mM DTT、50mM Tris-HCl pH6.8を加え、煮沸後、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動にかける。泳動後のゲルから蛋白質をプロッティングしたメンブレンを1%スキムミルク(和光純薬社製)を含むTBS(宝酒造社製)に浸し、室温で振盪し、続いて抗 $\sigma^{70}$ 抗体清を1%スキムミルクを含むTBS

Sで希釈したものに没し、室温で振盪する。統いて、メンブレンを0.01% Tween 20を含むTBSで洗浄し、バーオキシダーゼでラベルされた抗ウサギIgG抗体を1%スキムミルクを含むTBSで希釈したものに没し、室温で振盪する。統いて、メンブレンを洗浄した後、染色し、 $\sigma^{32}$ に相当する部分の染色の度合いから、 $\sigma^{32}$ の相対量を見積もる。

【0016】上記のようにして得られた $\sigma^{32}$ の含量の多い変異株について、 $\sigma^{32}$ の安定性を調べるために、バルスチエイス実験を行う。即ち、選択した変異株の最少培地における対数増殖期の培養液に<sup>35</sup>S-メチオニンを加えて1分間ラベルし、コールドメチオニンを加えて培養を続け、タイムコースをとって培養液の一部をトリクロロ酢酸で処理し、菌体を回収した後、抗 $\beta$ -ガラクトシダーゼ抗体による免疫沈降反応でGF807産物を特異的に回収し、SDS-PAGEにかけ、オートラジオグラフィで解析する。1分、2分、4分のチエイスで野生型よりも顕著にGF807産物の安定化が認められるものを選択する。

【0017】上記の操作により、本発明の $\sigma^{32}$ を安定化し得る大腸菌変異株を取得することができる。その1例は、実施例に示すように、p1sXのN末端領域に挿入変異を有する変異株である。ここにp1sX遺伝子は、sn-グリセロール-3-リン酸要求性を示す変異株において、sn-グリセロール-3-リン酸アシルトランスクレーバー遺伝子p1sBの変異株で発見された遺伝子であって、その機能は未だ不明である。

【0018】本発明において不安定蛋白質安定化変異株を取得する他の方法は、既知のプロテアーゼ欠失株について、 $\sigma^{32}$ を安定化する株をスクリーニングする方法が挙げられる。 $\sigma^{32}$ の安定化に関与する因子として、DnaK、DnaJ、GrpE等が知られている(Tilly, K. et al., J. Bacteriol., 171, 1585-1589 (1989))。しかし、これら自身はプロテアーゼではない。また大腸菌には、熱ショック誘導性でエネルギー依存性のプロテアーゼが2種(Lon, C1p)知られているが、いずれも $\sigma^{32}$ の分解には直接関与していないといわれている(Maurizi, M. R., Experientia 48, 178-201 (1992))。

【0019】そこで、 $\sigma^{32}$ を安定化する株を直接スクリーニングする必要がある。被験菌は、各種のプロテアーゼ欠失株を $\lambda$ GF807で溶原化し、あるいはMC4100 $\lambda$ GF807株にP1トランスクレーバーにより他のプロテアーゼ欠失株からプロテアーゼ欠失部位を導入することにより調製し、GF807の産物( $\sigma^{32}$ と $\beta$ -ガラクトシダーゼの融合蛋白質)の安定性を前記と同様にして測定する。プロテアーゼ欠失株の $\lambda$ GF807による溶原化を行う方法は以下のとおりである。L培地で一晩培養したプロテアーゼ欠失株の培養液を寒天1.5%を含むL培地のプレートにまき、コンラージ棒で均一

にひろげ、 $\lambda$ GF807溶液をスポットする。これを37°Cで一晩保温し、スポットの部分から菌をかきとり、X-gal(40mg/L)を含むL培地プレートにひろげ、37°Cで一晩培養後、青いコロニーを選択することにより、プロテアーゼ欠失株の $\lambda$ GF807による溶原菌が得られる。

【0020】また、MC4100 $\lambda$ GF807株へのP1トランスクレーバーは、例えば以下のようにして行う。すなわち、P1virファージを増殖させようとする菌株(形質導入の供与菌、ここではプロテアーゼ欠失株)をL培地で一晩培養し、培養液をL培地に加えて振盪培養する。これに0.1M CaCl<sub>2</sub>、P1virファージ液を加えて、培養液が透明になるまで振盪を続ける。培養液が透明になったら、クロロホルムを加え、遠心分離にかけ、上清を回収する。

【0021】一方、MC4100 $\lambda$ 807株をL培地で37°Cで一晩培養した培養液を遠心分離にかけ、菌体を回収し、0.1M MgCl<sub>2</sub>、0.005M CaCl<sub>2</sub>に懸濁する。この菌液と先に調製したP1virファージ液を混合し、室温で静置する。統いて、1M Na-Citrateを加え、遠心分離にかけ、菌体を回収し、再び1M Na-Citrateに懸濁する。これを適当な選択寒天培地に塗布し、培養することによってプロテアーゼ遺伝子の欠失が形質導入されたMC4100 $\lambda$ 807株の変異株が得られる。

【0022】その結果、実施例に示すように、大腸菌SG22094株に $\lambda$ GF807を溶原化して得たSG22094 $\lambda$ GF807株、およびMC4100 $\lambda$ GF807株にSG22094株の $\Delta$ c1pP::Cmとlon-510変異をP1トランスクレーバーにより導入して得た変異株が、GF807の産物に対する優れた安定性を示し、本発明の目的物であることがわかった。SG22094株は、C1pプロテアーゼ遺伝子およびLonプロテアーゼ遺伝子が欠失している株であり、Dr. S. Gottesman(National Institutes of Health, National Cancer Institute, Bethesda, Maryland 20892)より入手できる。

【0023】以上のようにして得られる本発明の不安定蛋白質を安定化する大腸菌は、従来の大腸菌で発現させても分解を受けやすく高発現が困難な外来有用蛋白質も安定化し得るので、汎用性の高い蛋白質発現系宿主として使用することができる。すなわち、本発明はこれらの大腸菌変異株を常法により外来有用蛋白質をコードするDNAを含む組換えDNA分子で形質転換し、該形質転換体を用いて該外来有用蛋白質を製造する方法をも提供するものである。

【0024】外来有用蛋白質を発現するように大腸菌変異株を形質転換するには、外来有用蛋白質をコードするDNAを用いて、公知の方法(例えばSambrook, J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd

ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989年等参照)を参考にして行えばよい。すなわち、まず前記DNAをプロモーター配列、SD配列、複製開始点、マーカー遺伝子等発現制御に必要な配列を有する適当なベクターに組み込む。使用しうるベクターの例としては、pET、pTrc99A、pKK233、pPL-Lambdada等が挙げられる。ここで例示したベクターはいずれも市販されているので容易に入手することができる。次に、外来有用蛋白質をコードするDNAが組み込まれた発現用ベクターを塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法等の方法で該大腸菌変異株に導入し、目的とする形質転換体をスクリーニングする。得られた形質転換体は公知の方法で培養し、必要があれば発現誘導を行う。形質転換体からの目的蛋白質の回収および精製は、形質転換体を破碎して遠心分離し、上清を回収し、ゲル通過や各種のカラムクロマトグラフィー等、蛋白質の精製に使用されている通常の方法で精製すればよい。また、目的蛋白質がペリプラズムに存在する場合には、Willskyらの方法(J. Bacteriol., 127, 595-609 (1976))等を参考にして精製することができる。

## 【0025】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

## 【0026】実施例1

大腸菌MC4100λGF807株へのmini Tn10(tet)による挿入変異の導入

大腸菌MC4100λGF807株は、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1991) Vol. 88 p10515-10519 (Nagai, H. et al.)に記載の方法に従って作成されたものを、その著者より譲り受けた。このMC4100λGF807を5mLのL培地で37°Cで一晩培養したのち、20mLのL培地を新たに加え、37°Cで30分培養した。この菌液に40μLのλ1098 (1.9×10<sup>11</sup>pfu/mL) ファージ液、0.5mLの1M MgSO<sub>4</sub>を加え、37°Cで60分振盪培養した。培養液をL培地で100倍に希釈し、10μLをテトラサイクリン10mg/Lを含むMacConkey-Lactose 寒天培地(Difco 製)1枚に塗布した。

## 【0027】実施例2

挿入変異株のスクリーニング

λ1098により処理された大腸菌MC4100λGF807を、テトラサイクリン10mg/Lを含むMacConkey-Lactose 寒天培地(Difco 製)上で、39.5°Cで一晩培養し、赤色の濃いコロニー(β-ガラクトシダーゼ活性の強い株)を選別した。この試験により約100個のテトラサイクリン耐性株から約1個の赤の程度の濃いコロニーを選択した。

## 【0028】実施例3

σ<sup>70</sup>含量の多い変異株の選択

赤の程度の濃いコロニーを形成する候補株24株を37°CのL培地で対数増殖中期まで培養し、培養液0.5mLに0.55mLの10%TCAを加え生育を止めた。これを10000rpm、10分間の遠心分離にかけ沈殿をアセトンで洗浄、乾燥後、50μLの1%SDS、10mM Tris-HCl pH8.0に溶解し5分間煮沸した。さらに10000rpm、10分間の遠心分離にかけ、上清の含有蛋白質量をMicroBCA蛋白質定量キット(ピアス社製)を用いて測定した。

- 10 【0029】蛋白質20μg相当に等体積の0.1%PB、10%グリセロール、2%SDS、100mM DTT、50mM Tris-HCl pH6.8を加え、5分間煮沸後、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。泳動後のゲルからイモビロンPメンブレン(ミリポア社製)に蛋白質をプロッティングした。プロッティングにはアトーナー社のプロッティング装置を用いた。プロッティングの終わったメンブレンを1%スキムミルク(和光純薬社製)を含むTBS(宝酒造社製)に浸し、室温で1時間振盪し、続いて抗σ<sup>70</sup>抗血清を1%スキムミルクを含むTBSで1000倍に希釈したものに浸し、室温で1時間振盪した。続いて、メンブレンを0.01%Tween 20(和光純薬社製)を含むTBSで20分間ずつ3回洗浄し、バーオキシダーゼでラベルされた抗ウサギIgG抗体(ペーリングガーマンハイム社製)を1%スキムミルクを含むTBSで800倍に希釈したものに浸し、室温で1時間振盪した。続いて、メンブレンを0.01%Tween 20(和光純薬社製)を含むTBSで20分間ずつ3回、TBSで1回洗浄し、コニカイムノスチイン(コニカ社製)を用いてメンブレンを染色し、σ<sup>70</sup>に相当する部分の染色の度合いから、σ<sup>70</sup>の相対的量を見積もった。この試験により、野生株よりも顕著にσ<sup>70</sup>含量の多い変異株を5株選択した。
- 20 【0030】この中の一株MKT8からゲノムDNAを分離した。方法は以下のとおりである。この変異株を2mLのL培地で37°Cで一晩培養し、12000rpm、5分の遠心分離で菌体を集めた。567μLのTE(10mM Tris-HCl、2mM EDTA、pH8.0)に懸濁して、10%SDSを30μL、20mg/mLのプロテイナーゼK(シグマ社製)溶液を3μL加えて攪拌し、37°Cに1時間保温した。これに、5M NaClを0.1mL加え、攪拌し、さらに、10%C TAB、0.7M NaClを80μL加え、65°Cに10分保温した。つづいて、800μLのクロロホルム/イソアミルアルコール混液(クロロホルム24体積にイソアミルアルコール1体積を加えたもの)を加え、攪拌した。12000rpm、5分の遠心分離で水相とクロロホルム相に分離し、水相を回収後、800μLのフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール混液(TE飽和フェノール(和光純薬社製)とクロロホルム/イソアミルアルコール混液を等量ずつ混ぜたも
- 30 40 50

の)を加え、攪拌後、12000 rpm、5分の遠心分離で水相とフェノール／クロロホルム相に分離した。水相に300 μlのイソプロピルアルコールを加え、攪拌後、12000 rpm、5分の遠心分離でDNAを沈殿させた。沈殿を70%エタノールで洗浄し、乾燥後、DNAを100 μlのTEに溶解した。

【0031】このDNA溶液10 μlとCharomid(ニッポンジーン社製)1 μgを制限酵素BamHI(宝酒造社製)で消化し、ライゲーションキット(宝酒造社製)を用いてライゲーション後、入パッケージングキット(ニッポンジーン社製)を用いてDNAをパッケージングし、大腸菌MR180株を形質転換した。これを、テトラサイクリン10 mg/Lとアンビシリン50 mg/Lを含むL培地のプレートに塗布し、30°Cで一晩培養した。得られたテトラサイクリン耐性かつアンビシリン耐性の菌を50 mlのL培地で30°Cで一晩培養し、菌液からQIAGEN(QIAGEN社製)でプラスミドを抽出し、プラスミド1 μgをバーキンエルマーアップライドバイオシステムズ社製のDNA塩基配列解析キットおよび解析装置で解析した。解析用のプライマーの塩基配列は、以下のとおりである。

プライマー1：5'CCATTGCTGTTGACAAAGGG

プライマー2：5'CCAACGCTTTCGGAGATC

その結果、この変異株はp1sX遺伝子のN末端領域をコードする位置への挿入変異であることが明らかになった。

#### 【0032】実施例4

既知プロテアーゼ欠失株から $\sigma^{70}$ 安定化株の選択

(1) MC4100λGF807株のP1トランスタクションによる既知プロテアーゼ欠失株の作成  
プロテアーゼ欠失株から調製したP1virファージ溶菌液をMC4100λGF807株に感染させ、プロテアーゼ近傍または内部の選択マーカーにより、プロテアーゼ遺伝子の欠失がMC4100λGF807株に導入された組み換え株を選択した。

【0033】(2) P1トランスタクションによるMC4100λGF807株への大腸菌SG22094株の $\Delta c1pP::Cm$ の導入  
SG22094株をL培地で一晩培養し、培養液0.1 mlを5 mlのL培地に加え、約90分振盪培養した。これに、0.1M CaCl<sub>2</sub>を0.05 ml加え、P1virファージ液( $1 \times 10^{10}$  pfu/ml)を0.2 ml加えて、培養液が透明になるまで振盪を続けた。培養液が透明になったところでクロロホルムを3滴加え、3000 rpmで10分の遠心分離にかけ、上清を回収した。一方、MC4100λ807株をL培地で37°Cで一晩培養した培養液を3000 rpmで10分の遠心分離にかけ、菌体を回収し、1 mlの0.1M MgCl<sub>2</sub>、0.005M CaCl<sub>2</sub>に懸濁した。この菌液0.1 mlと先に調製したP1virファージ液0.1 ml

1を混合し、室温で15分静置した。続いて、0.2 mlの1M Na-Citrateを加え、3000 rpmで10分の遠心分離にかけ、菌体を回収し、再び、0.1 mlの1M Na-Citrateに懸濁した。これを20 mg/Lのクロラムフェニコールを含むL培地のプレートに塗布し、37°Cで培養することによって $\Delta c1pP::Cm$ が形質導入されたMC4100λ807株の変異株を得られた。

【0034】このようにして得られた変異株の中の一株MKH1011について、以下のようにしてPCRを行い、lon-510変異を同時に持つ株であることを確かめた。変異株のコロニーを10 μlのTEに懸濁し、その1 μlを錆型DNAとして、GeneAmpキット(バーキンエルマーアップライドバイオシステム社製)およびモデル9600サーマルサイクラー(バーキンエルマーアップライドバイオシステム社製)を用いてPCR反応を行った。反応は96°C 1分、55°C 1分、72°C 3分のサイクルを25回行った。PCR反応物をアガロースグレ電気泳動にかけ、反応生成物の大きさにより、1 lon-510変異の有無を確かめた。PCRに用いたプライマーDNAの塩基配列は以下のとおりである。

プライマー3：5'CGCTGGATGCTATCGCTAAG

プライマー4：5'AAGGCCAAGCCCCGATCCGCC

このようにして、変異遺伝子がlonおよびC1pプロテアーゼ遺伝子である二重変異株を得ることができた。

#### 【0035】実施例5

バルス-チエイス実験による $\sigma^{70}$ の安定性の検討

(1) 各菌株(実施例4で得られたlonおよびC1pプロテアーゼ遺伝子の二重変異株、lonプロテアーゼ遺伝子の単独変異株、C1pプロテアーゼ遺伝子の単独変異株、野生株)を37°C、M9培地(6 g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、3 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.5 g/L NaCl、1 g/L NH<sub>4</sub>Cl、0.1 mM CaCl<sub>2</sub>、1 mM MgSO<sub>4</sub>)で対数増殖期まで培養し、100 μCi/mlで<sup>35</sup>S-Met(45.0 TBq/mmol)を添加した後1分後に100 μlをサンプリングして110 μlの50%TCA溶液に加えた。これをチエイス開始として図1に示された時間ごとに同量をサンプリングして同様に処理した。これらを100 rpm、10分間の遠心分離にかけ、沈殿をアセトンで洗浄し、乾燥した後、50 μlの1%SDS、10 mMトリス塩酸(pH 8.0)に溶解し、5分間煮沸した。さらに10000 rpm、10分間の遠心分離にかけ、上清25 μlに対し1 mlの2%TX100、トリス緩衝生理食塩水を加え、抗 $\sigma^{70}$ 抗血清を1 μl添加して、4°Cで一晩静置した。

【0036】翌日、IgGSORB(The Enzyme Center社製)を10 μl添加し、さらに4°Cで1時間静置した後、10000 rpm、10分間の遠心分離にかけ、沈殿を1 mlの2%TX100、トリス緩衝生理食塩水

11

で3回、10 mMトリス塩酸(pH 8.0)で1回洗浄し、20 μlの0.1%BPB、10%グリセロール、2%SDS、100 mM DTT、50 mMトリス塩酸(pH 6.8)に溶解した。5分間煮沸した後、1'000 rpm、10分間の遠心分離にかけ、上清を SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけた。ゲルを乾燥した後、富士フィルム BAS 2000用IPに16時間露光し、BAS 2000を用いて $\sigma^{70}$ に相当するバンドの放射能を測定することにより、 $\sigma^{70}$ の量の時間経過に対する変化を測定した。

【0037】この実験の結果を図1に示す。図1から明らかなように、L<sub>on</sub>プロテアーゼ遺伝子、C<sub>1p</sub>プロテアーゼ遺伝子の単独の変異では安定化はほとんどみられないのに対し、L<sub>on</sub>プロテアーゼ遺伝子およびC<sub>1p</sub>プロテアーゼ遺伝子の二重変異株は、野生株に比べて約5倍の $\sigma^{70}$ の安定性の増大(半減期の延長)を示した。

\* 【0038】(2) 実施例3で得られたp<sub>1s</sub>X遺伝子の変異株と野生株を用いて、前記(1)と同様にしてバルス-チェイス実験を行った。その結果を図2に示すが、p<sub>1s</sub>X遺伝子の変異株は、野生株に比べて約3倍の $\sigma^{70}$ の安定性の増大(半減期の延長)を示した。

【0039】

【発明の効果】大腸菌内で発現された不安定蛋白質を安定に保持する変異遺伝子を有する本発明の大腸菌変異株は、発現した外来性有用蛋白質の菌体内分解を抑えることができるため、汎用性の高い蛋白質発現系宿主を提供することができる。

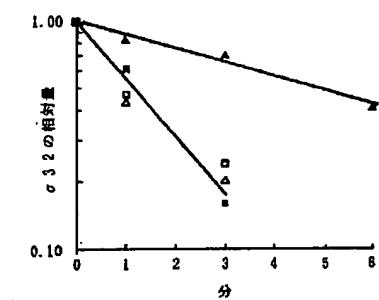
【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、L<sub>on</sub>プロテアーゼ遺伝子およびC<sub>1p</sub>プロテアーゼ遺伝子の二重変異株についてのバルス-チェイス実験の結果を示す図である。

【図2】図2は、p<sub>1s</sub>X遺伝子の変異株についてのバルス-チェイス実験の結果を示す図である。

\*

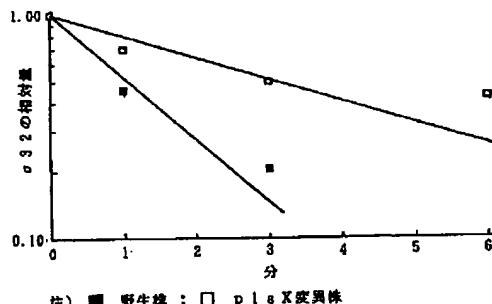
【図1】



注)

- 野生株
- L<sub>on</sub>プロテアーゼ遺伝子単独変異株
- △ C<sub>1p</sub>プロテアーゼ遺伝子単独変異株
- ▲ L<sub>on</sub>およびC<sub>1p</sub>プロテアーゼ遺伝子二重変異株

【図2】

注) ■ 野生株 □ p<sub>1s</sub>X変異株

フロントページの続き

(51)Int.C1.<sup>6</sup>

識別記号

府内整理番号

F I

技術表示箇所

C 12 R 1:19)

(C 12 P 21/02

C 12 R 1:19

1:21)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**